

妊娠関連蛋白 Pregnancy Zone Protein (PZP)

の動態と精製及びその機能に関する研究

奈良県立医科大学細菌学教室

橋 本 平 嗣

ALTERATION, PURIFICATION AND BIOLOGICAL EFFECTS OF PREGNANCY ZONE PROTEIN (PZP, PREGNANCY-ASSOCIATED α -GLOBULIN)

HIRATSUGU HASHIMOTO

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received January 30, 1989

Summary: A protein map was prepared by means of two-dimensional electrophoresis for serum specimens from pregnant women. The PZP (pregnancy zone protein) appearing on the map was identified, and anti-PZP serum was prepared using this protein as an antigen. In cases of normal pregnancy, PZP began to be detected in serum around the 8th week of pregnancy and its level reached a peak in the second trimester; thereafter, it remained almost unchanged or showed only a slight reduction until delivery. In patients with severe toxemia of pregnancy showing systemic edema, proteinuria (3 g/day) and hypertension (over 160 mmHg), the serum PZP level was much higher than in cases of normal pregnancy. Using the highly pure PZP obtained by the use of anti-PZP antibody, we assessed the biological effects of PZP on polymorphonuclear leukocytes (PMN) and mononuclear cells (MMC). This assessment provided the following results:

(1) A test with the fluorescent antibody technique disclosed that PZP binds well to PMN and MNC.

(2) In assessment of chemotactic ability with Boyden's method, PZP was found to elevate the chemotactic ability of PMN and to reduce that of MNC.

(3) When assessed with a lumiphotometer, ingesting ability and the bactericidal action of PMN and MNC decreased after exposure to PZP.

These results suggest that PZP suppresses cell-mediated immunity, and that it plays an important role in the maintenance of pregnancy.

Index Terms

pregnancy zone protein, toxemia, two-dimensional electrophoresis, immunosuppression

I 緒 言

妊娠における胎児の存続、発育のために母体血中蛋白

はさまざまに変化する。その中で Pregnancy-specific- β_1 -glycoprotein (SP1, Bohn, 1971), Pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A, Lin, 1973), Human chor-

ionic gonadotropin (HCG) 等は妊娠特異蛋白と呼ばれ妊婦血清のみに認められる¹⁾。それに対し PZP は妊婦血清中に多量認められると同時に、正常人やガン患者血清中にも若干認められるもの²⁾であり妊娠関連蛋白と呼ばれている。PZP は1959年 Smithies により発見³⁾、報告されて以来1973年まで Xm, Xh, Pal, SP₈, PAG, PAM, α_2 P, Pa と命名されたが、現在ではこれらは同一のものとされている。PZP の分子量は約35分、沈降係数は 12S で分子量17.2万の2つのサブユニットがジスルフィド結合で連結されており、等電点4.7、糖を約9.9%含み、その組成は、ヘキソース8.5%、ヘキソサミン0.5%、シアル酸0.9%から成るとされている⁴⁾。

今回2次元電気泳動⁵⁾(2 dimensional electrophoresis, 2DE)〔一次元目：等電点電気泳動 (Isoelectrofocussing; IEF), 二次元目：ポリアクリルアミド電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)〕を行うことによってポリアクリルアミドゲルの上に PZP スポットを鮮明に見出すことに成功した。さらに PZP は浮腫、蛋白尿、高血圧の合併した EPH type の重症妊娠中毒症では著明に増加することに気付いた。この PZP の生物学的活性については、これまで免疫抑制作用がありリンパ球の Phytóhemagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A) などのマイトゲンの刺激に対し抑制効果がある⁶⁾といわれているものの詳細に関しては不明な点が多い。そこで正常妊婦の PZP に対する特異抗血清を作製、妊娠経過による PZP 変動、中毒症での動態を検討するとともに血清より PZP を純化し、これを用いて、PMN, MNC への影響を Boyden 法を用いた走化性試験⁷⁾、ルミフォトメーターを用いた食食・還元能試験を用いて検討した⁸⁾。

II 実験方法

(1) 試薬

フェルマライト (pI. 3-10, 5-8, 2.5-5), CL-セファロース-4B, Zn-キレーティングセファロース 6B, プロテイン A セファロース, 高速液体クロマトグラフィー用スーパーボーズ 6, パーコールは Pharmacia 社 (Upsalla, Sweden) より、アクリルアミド, N,N'-メチレンビスアクリルアミド, イミノジ酢酸, 過硫酸アンモニウム, エチレンジアミンは半井化学薬品株式会社 (京都) より、N,N,N',N'-テトラメチレンジアミン, クマシーブリリアントブルー R250, リボフラビンと光純薬株式会社 (大阪) より、アガロース, ニトロセルロース膜は Bio-Rad 社 (Calif U.S.A.) より、ケモタキシスチャンパーはラボサイエンス社 (東京) より、ルミノールはベーリンガ

ーマンハイム社 (West Germany) より、ユニボアーメンブレンはスケレポアー社 (Calif U.S.A.) より、抗血清は全て Dako 社 (Glostrup Denmark) より入手した。

(2) 2次元電気泳動

真鍋らの報告⁹⁾をもとに、1次元目の等電点電気泳動は SDS, メルカプトエタノールを含まないシステムで行い、4.67%アクリルアミド, 7.72%フェルマライト (pI 3-10:5-8:2.5-5=2:1:1) を含む径 1.5mm 長さ 6.5 cm のゲルカラムを用い、200V の定電圧で90分、さらに 500V で6時間冷却下で泳動した。緩衝液は陽極に 0.01M イミノジ酢酸, 陰極に 0.01M エチレンジアミンを用いた。2次元目は SDS を含まない 3%~20%のポリアクリルアミドの濃度勾配ゲルを用いて 25mM トリス・グリシン緩衝液, pH 8.3 で 100V の定電圧で泳動した。

(3) イムノ・プロットイング

2次元電気泳動終了後ポリアクリルアミドゲルより20%メタノールを含む 25mM トリス・グリシン緩衝液, pH 8.3 でニトロセルロース膜に 60V の定電圧で4時間冷却下 (6°C) にマルチテンプ II (LKB 社, Vpsalla, Sweden) にて蛋白のスポットを転写した。各スポットの同定は特異抗血清を用い ABC 法にて行った。

(4) ウサギ抗 PZP 抗血清の精製

正常妊婦血清を2次元電気泳動した後得られた PZP のスポットを切り出し、よく細砕後フロイント完全アジュバント (Freund Complete Adjuvant, FCA) と共にウサギの皮下に14日間隔で3度免疫した。最終追加免疫より14日後に採血、得られた抗血清は更に正常非妊婦血清を用いて免疫吸着を行った。この正常非妊婦血清は 2.5%グルタルアルデヒドで4時間、室温で固相化した後、細砕し pH 2.8 グリシン塩酸緩衝液で十分洗浄し PBS で平衡化したものを使用した¹⁰⁾。

(5) PZP の定量

試料血清は末梢より出来る限り溶血しないように採血し 37°C で30分間静置した後上清を 3,000 rpm で10分遠心分離し PZP レベルを測定するまで -70°C で保存した。50mM トリス, 50mM グリシン, 10mM EDTA・2Na, 0.3M NaCl, 0.1% Na₂S₂O₃, pH 8.0 で調整した 1%アガロースプレートを用いた単純放射免疫拡散法 (Single radial immunodiffusion, SRID)¹¹⁾により PZP を定量した。対象として正常妊婦60名 (妊娠週数 5w~41w) を、妊娠中毒症患者は E.P.H 各 type に分類し、EPH type 12名、それに各単独症例 E type 5名, P type 6名, H type 6名について定量、PZP レベルを比較した。

(6) PZP の精製

(i) Zn キレートリング・セファローズ 6B: 蒸留水でよくキレートリングセファローズを洗い 250ml の ZnCl_2 溶液 (1mg/ml) をゆっくり通し Zn を結合させ Zn キレートリングセファローズを調整する。蒸留水で十分に洗浄した後 0.5 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液 pH 6.5 で本セファローズを平衡化する。このゲル 50 ml に同緩衝液で一夜透析した妊婦血清 100 ml を繰り返し 2 度通過させた。

(ii) 抗 PZP アフィニティー・クロマトグラフィー: Zn キレートリング・セファローズに結合しなかった分画を 5 mM EDTA を含む生理的リン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline, PBS) pH 7.4 で十分に透析後、同緩衝液で平衡化したウサギ抗 PZP 抗血清の IgG 分画を結合した CL-セファローズ 4B に繰り返し 2 度吸着させ、十分に洗浄した後 3 M MgCl_2 を含む 0.6 M NaCl 溶液 (pH 4.5) で結合した PZP に富む分画を溶出した。

(iii) プロテイン A 結合セファローズ 4B によるクロマトグラフィー: 抗 PZP アフィニティー・クロマトグラフィーよりの溶出分画を PBS で透析後、混在している IgG をプロテイン A-セファローズ 4B に通過させ除く。

(iv) 高速液体クロマトグラフィー (High pressurer liquid chromatography, HPLC): プロテイン A セファローズ 4B の通過分画を濃縮後 PBS で平衡化した Superose 6 を用いた高速液体クロマトグラフィーにて分離し、280 nm の吸光曲線の第 2 番目のピークを集め純化 PZP 標品とした。

(7) SDS-PAGE

3.8% アクリルアミドを用いた SDS-PAGE で PZP の純度を検定、5% メルカプトエタノールで 100°C、1 分処理し PZP の分子内ペプチド構造を分析した。

(8) Ouchterlony 免疫拡散法¹²⁾

50 mM トリス、50 mM グリシン、10 mM EDTA・2Na, 0.3 M NaCl, 0.1% NaN_3 , pH 8.0 で調整した 2% アガロースプレートで Ouchterlony 免疫拡散法を行い PZP と SP1, PAPP-A との免疫学的交差反応を検討した。

(9) 細胞走化性の測定

55% 及び 74% パーコールを生理的食塩水で作成、これを重層して正常男子全血より PMN と MNC を分離しそれぞれ 2×10^6 /ml となるように PMN は 0.5% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 加 MEM 培養液 (BSA/MEM) に MNC は 0.5% BSA 加 RPMI-1640 培養液 (BSA/RPMI-1640) に浮遊した。PZP の結合性を検討する実験では MNC をさらにプラスチック製培養器に入れ 37°C 2 時間 CO_2 チャンバー内で培

養後、プラスチック吸着性の細胞と非吸着性の細胞に分けた。ケモタキシス・チャンバーを用い Boyden 法により PZP が PMN, MNC の走化性にどのように作用するかを見た。走化性因子としてカゼインをケモタキシスチャンバー下室に 0.6 mg/ml の濃度で入れた。PMN と MNC を PZP と 37°C で 10 分間反応後、ケモタキシスチャンバー上室に入れ、PMN は 30 分、MNC は 120 分、37°C、5% CO_2 存在下に静置した。ケモタキシスチャンバーの上室と下室の間には、PMN の走化性測定用として 3μ 径の穴を持つユニポアメンブランを MNC の走化性測定用として 5μ 径の穴を持つユニポアメンブランを使用した。これらのメンブランは反応測定後 100% エタノールで固定、ババニコロフにて染色し、裏面に遊走している細胞数を顕微鏡下に計測した。

(10) 蛍光抗体法

前記(9)の方法で PMN と MNC を分離、PBS で洗浄後 1×10^6 /ml に調製、これに PZP を最終濃度 0.5 mg/ml に加え 37°C で 10 分間 5% CO_2 存在下で反応させ、冷却した PBS で 3 回洗浄後、スライドガラスに塗抹、十分に風乾後冷アセトンで 10 分間固定した。正常ヤギ血清で一晩ブロックしウサギ抗ヒト PZP 抗血清を室温で 30 分間反応、更に FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG の、F (ab)₂ 分画を室温で 30 分間反応させ、これらの PMN, MNC を蛍光顕微鏡下で観察した。

(11) 食食・還元能測定

PZP の PMN, MNC への食食・還元能への影響をルミノール酸化反応¹³⁾を利用したルミフォトメーターを用いて検討した。PMN, MNC を 3×10^6 /ml に PBS で調整しその 200 μ l に種々の濃度の PZP とルミノール 20 μ l (2 mg/ml) を加え、30°C で 10 分間反応させ、20 μ l の正常人血清でオプソナイズしたザイモサン (10 mg/ml) を加えその発光量をプロットした。

III 結 果

(1) 2DE パターンと PZP の同定

正常非妊婦血清の 2DE による蛋白染色のパターンを Fig. 1 に示す。泳動後イムノブロッティングを行い蛋白染色にて出現するスポットのうち 13 個を同定した。図中 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m のスポットはそれぞれ IgG, α_2 マクログロブリン, IgM, ハプトグロビン, IgA, リボプロテイン, β_2 グリコプロテイン, トランスフェリン, ヘモベキシン, セルロプラスミン, Gc グロブリン, α_2 -HS グリコプロテイン, アルブミンである。等電点電気泳動では等電点 (isoelectric point, pI) の低いファルマライトを多く使用して、主として pI 3 から

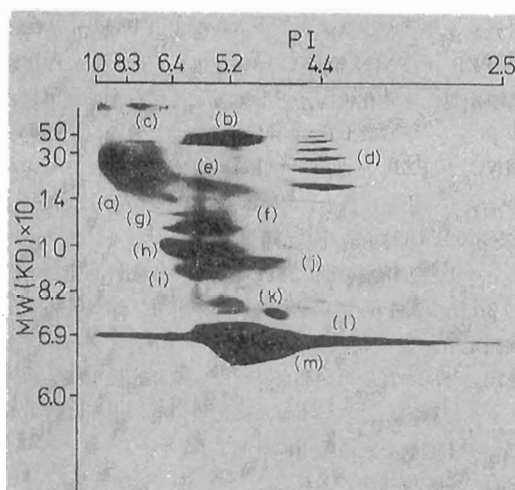


Fig. 1. 2DE analysis of normal non-pregnant woman's serum.

- (a): IgG; (b): α_2 -macroglobulin;
 (c): IgM; (d): haptoglobin; (e): IgA;
 (f): lipoprotein; (g): β_2 -glycoprotein;
 (h): transferrin; (i): hemopexin;
 (j): ceruloplasmin; (k): Gc globulin;
 (l): α_2 -HS-glycoprotein; (m): albumin

pI 7 の領域を効率よく分離している。IgG (a) のスポットは広い pI 範囲にわたっている。pI 4.5, MW 14万~50万に亘る広範囲に広がるスポットがハプトグロビン (Haptoglobin, Hp) である (d)。Fig. 2 に妊娠初期3ヵ月 (1st trimester), 中期3ヵ月 (2nd trimester), 後期3ヵ月 (3rd trimester) における正常妊婦血清の 2DE パターンを示すが全体的に見て, IgG (a), アルブミン (m) の減少, マクログロブリン (b), リボプロテイン (f) の増加が見られる。Hp スポット近傍に Hp と重なるように PZP のスポット (矢印) が出現する。pI 4.7, MW 30万の単一のスポットである。1st trimester ではそのスポットは非常に弱く, 不鮮明であるが 2nd trimester, 3rd trimester では増強していくことが分かる。

Fig. 3-1 に EPH type の重症妊娠中毒症者の血清の 2DE による分離マップを示すが, 正常妊婦血清で見られる PZP のスポットよりはるかに鮮明で大きな PZP のスポット (矢印) が出現している。逆にこの患者では Hp のスポット (d') は極端に減少している。この EPH type の患者の分娩1週間後 (Fig. 3-2) には, Hp のスポットは正常のパターンに回復し, 逆に PZP のスポット (矢印) は正常妊婦血清で見られるよりも減少かつ縮小を示した。

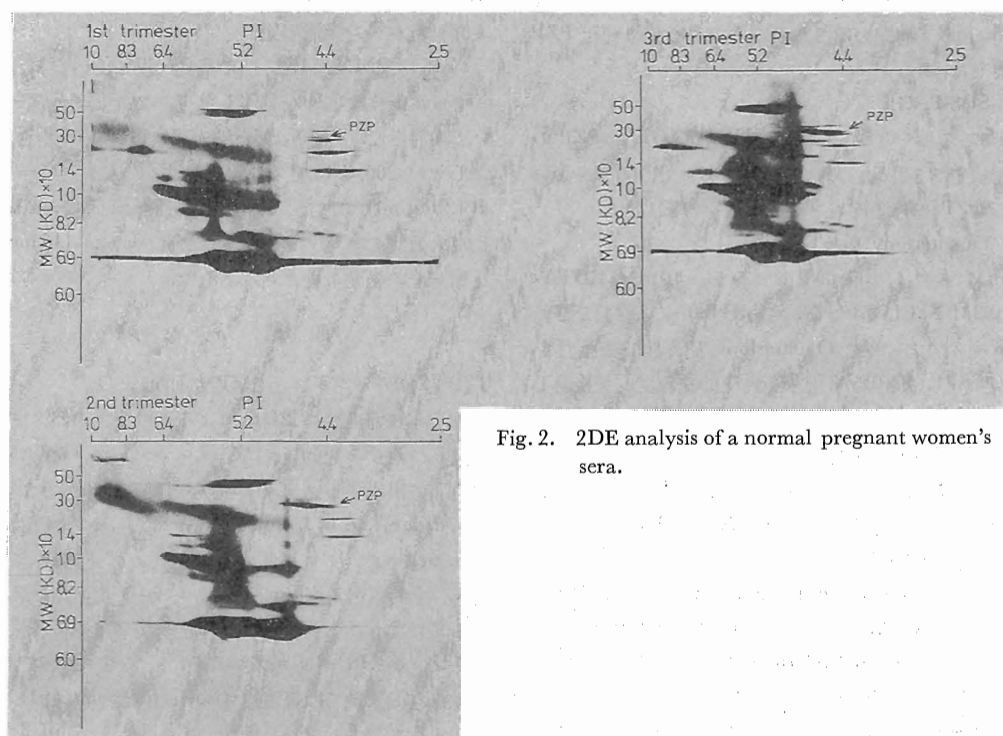


Fig. 2. 2DE analysis of a normal pregnant women's sera.

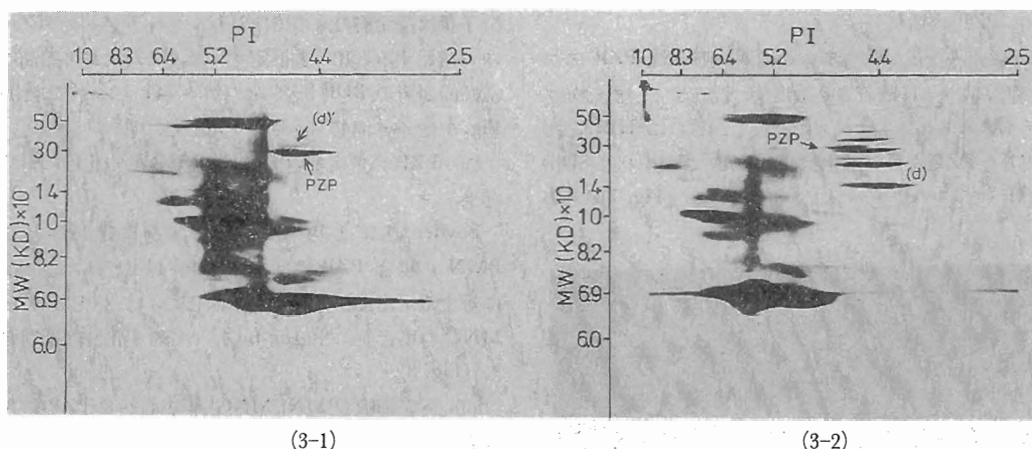


Fig. 3. 2DE analysis of a toxemic pregnant woman's serum.
(3-1): EPH type, 32 weeks gestation
(3-2): the same woman's serum, but 1 week after delivery

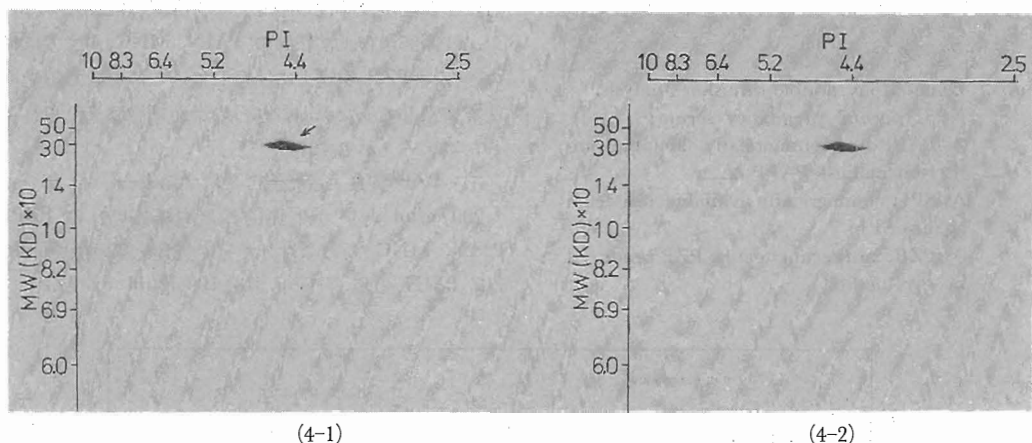


Fig. 4. Immuno-blotting of normal pregnant woman's serum with anti-PZP-antisera.
(4-1): by a lot of commercially available anti PZP
(4-2): by anti-PZP-antisera produced by my method as described in this text

(2) 抗 PZP 抗体の作製

正常妊婦の血清の 2DE を行い、PZP のスポットを含むゲルの細片を抗原とし、家兎を免疫し、得られた粗抗体に含まれる PZP 以外の血清成分に対する抗体は、正常非妊婦血清で免疫吸着を行い、非吸着分画を PZP に対する特異抗体とした。この抗体の特異性は正常妊婦血清を 2DE で分離した後のイムノブロットング (Fig. 4-2) で確認したが、このスポットは市販の PZP 特異抗体による正常妊婦血清の 2DE 後のイムノブロットングのパターン (Fig. 4-1) と同一であった。

妊娠に特異とされる SPI 抗原、PAPP-A 抗原に対するこの抗 PZP 抗体の反応性を Ouchterlony 免疫拡散法で

検討したところ (Fig. 5) 正常妊婦血清と本抗 PZP 抗体または抗 PAPP-A 抗体との間に生じる沈降線は各 1 本のみ認められ、抗 SPI 抗体との間には 2 本認められた。またこれらの沈降線は完全にクロス (cross) していた。

(3) 正常ならびに異常妊娠における PZP レベル

PZP は正常妊婦の場合、SRID で妊娠 8 週頃より検出でき 2nd trimester でピークとなり、その後分娩まで低下傾向はあるものの、ほぼ一定の値を示した。EPH Type の重症妊娠中毒症患者では、同じ妊娠週数の正常妊婦の約 3 倍の PZP 値を示した。E Type, P Type, H Type の各単独の中毒症例では正常妊婦の PZP 値と有意な差は認められなかった (Fig. 6)。

(4) PZP の精製

Zn キレートカラムの通過分画を抗 PZP アフィニティカラムに吸着させ溶出後、混在する IgG をプロテイン A・セファローズで除去し、さらに HPLC で純化した PZP を最終純化標品とした。この標品は SDS-PAGE で単一の染色バンドとして示され (Fig. 7), その

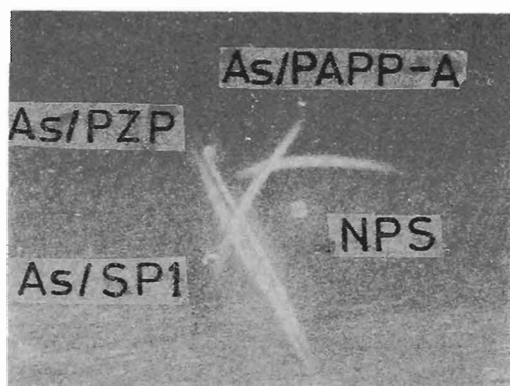


Fig. 5. Ouchterlony double diffusion analysis.
NPS: normal pregnancy serum;
As/PAPP-A: commercially available antiserum against PAPP-A;
As/SP1: commercially available antiserum against SP1;
As/PZP: antiserum against PZP produced by my method

分子量は還元前のもものでは31万、メルカプトエタノールにて還元すると18万と推定された。また、この標品は正常妊婦血清の 2DE 後イムノブロットングで既出の Fig. 4 と全く同じパターンを示した。

(5) PZP の炎症細胞 (PMN, MNC) 走化性に対する効果

Boyden 法によりケモタキシスを検定したところ PMN の場合 PZP 濃度 $120 \mu\text{g/ml}$ 以上では、カゼインに対する走化性を著明に上昇させた。しかしながら、MNC の場合逆に $120 \mu\text{g/ml}$ 以上では走化性は抑制された (Fig. 8)。

(6) 炎症細胞 (PMN, MNC) 膜表面への PZP 結合性の検討

PZP のこれら細胞膜への結合性は蛍光抗体法により検索され、PMN, MNC とともに膜表面のみがリング状に染色された (Fig. 9)。MNC の中ではプラスチック非吸着性の細胞が吸着性の細胞よりも強く染色された。また、妊娠36週の正常妊婦の PMN, MNC がすでに自己の内在性 PZP を膜上に結合しているかを同じ蛍光抗体法で検索してみたが、これらの炎症細胞は染色されなかった (データ示さず)。

(7) PZP 食食・還元能に及ぼす効果

$200 \mu\text{g/ml}$ という生理的濃度 (妊娠時) の PZP は PMN, MNC 両方に対してその食食・還元能を抑制した。PMN の場合 (Fig. 10) $100 \mu\text{g/ml}$ の PZP でも

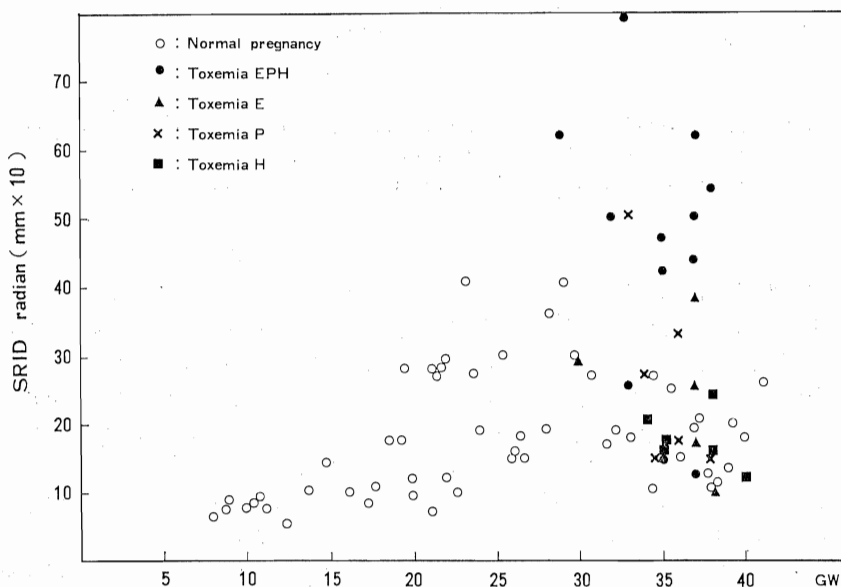


Fig. 6. PZP levels at various gestational stages.
PZP amounts were quantified by the single radical immunodiffusion method.

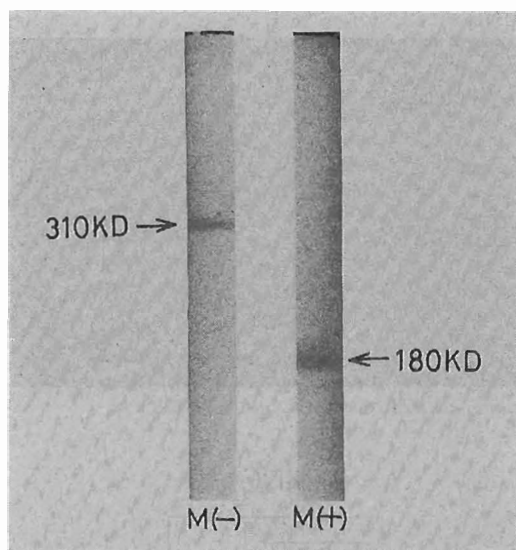


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of the purified PZP preparation.

Analysis was done without mercaptoethanol [M(-)] or in the presence of mercaptoethanol [M(+)].

PZP 非添加群の50%程度の抑制をみた。

IV 考 察

2次元電気泳動法は蛋白質を効率よく分離させ、さらにはそれぞれ蛋白質の量的な変化をも推測することを可能としている。1975年 O'Farrell によって等電点電気泳動と SDS-PAGE とを組み合わせた2次元電気泳動が行われて以来、改良が加えられ現在では SDS, 尿素, メルカプトエタノール等のタンパク変性剤を用いより高い分離能を有するものまで普及している。しかしながらその為にタンパク質の特性に変化をきたし、本来の高次構造を保持するものではなく、単に分析手段として利用されているだけのものも多い。

真鍋らによって開発された上記のようなタンパク質変性剤を含まない系ではみごとにタンパクの高次構造は保持される。しかし、メルカプトエタノールがないとジスルフィド結合が解離されないために Hp では monomer, dimer, tetramer …… と Fig. 2 のごとくうろこ状を示し構成ペプチド鎖だけのスポットにはならない等、全体として変性剤の有無で分離後のスポットの概観は著しく異なってくる。本研究では、一次元等電点電気泳動にフルマライト 2.5-5 と 5-8 を等量加えた、そのために酸性側を中心としたパターンになる。pI 3-10 を少量加えたのは 8 以上の等電点をもつ物質をもゲル内に保持

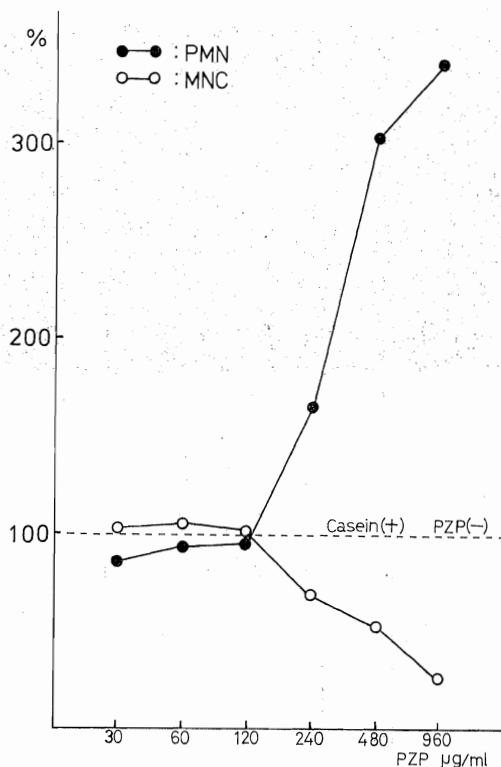


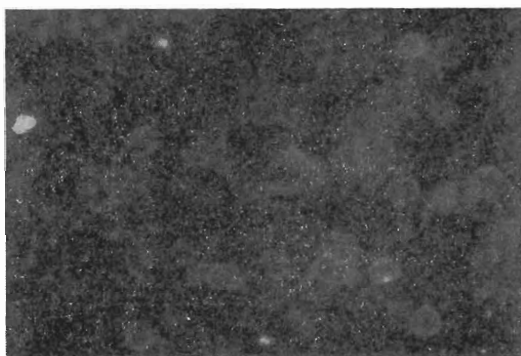
Fig. 8. Effect of PZP on locomotion of PMN and MNC by casein.

The locomotion of these cells without any PZP is expressed as 100%.

するためである。

Immuno blot により同定した各 spot は真鍋らの報告とよく一致するものであった。正常妊婦血清 PZP 値の変動は諸家らの報告¹⁴⁾¹⁵⁾とよく一致し 2nd trimester 28W~30W でピークをむかえる。又 PZP はビル (エストロゲン, プロゲステロンの合剤) を服用している患者で上昇しておりエストロゲンによってその産生が増強されるらしい。Stimson ら¹⁶⁾は、エストロゲン添加培養白血球の表面に蛍光抗体法により PZP が産生されることを報告しているが、我々の研究では重症妊娠中毒症 (EPH type) で極めて高い PZP 値を示すわけであるが一般的にそういった患者のエストロゲンのレベルは正常妊婦に比し低値であり PZP 値とエストロゲン値の相関は見い出せなかった。また E.P.H. の各因子と PZP 値との相関もなかった。少なくとも PZP 値の変動でみる限り、EPH type の重症妊娠中毒症は単純に E.P.H. 各因子の合わさったものではなく、別の病態が存在する可能性があると考えられる。

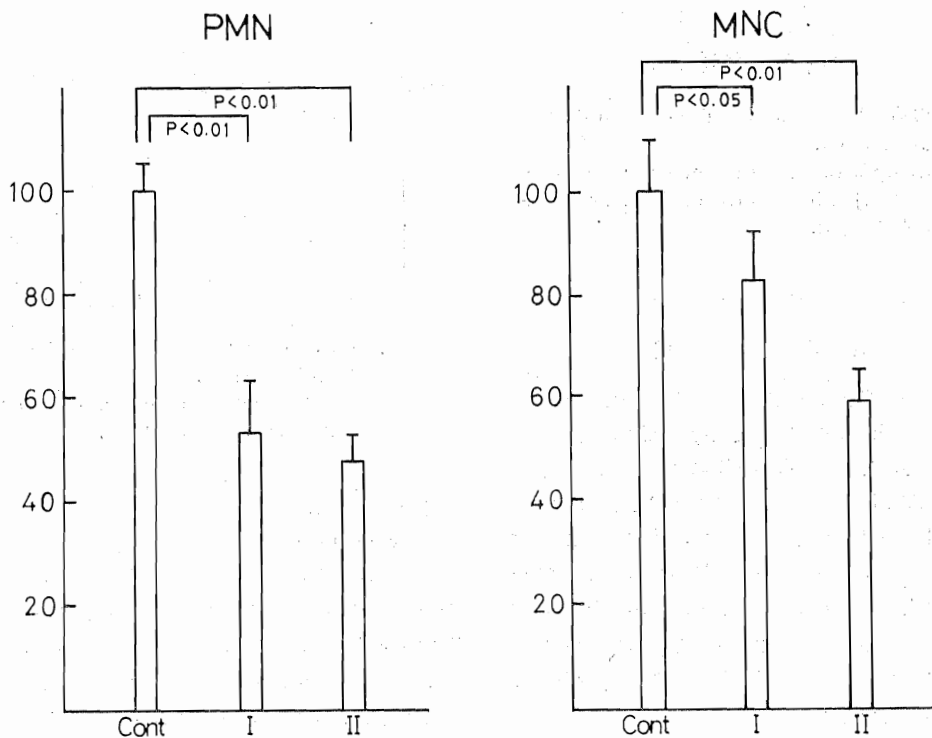
PMN



MNC



Fig. 9. Immunofluorescence study on localization of PZP on PMN and on MNC.

Fig. 10. Effect of PZP on phagocytosis of zymosan by PMN and by MNC. Cont: no PZP; I: 100 μ g PZP added; II: 200 μ g PZP added

PZP は α_2 -マクログロブリンと高い類似性を示し¹⁷⁾、¹⁹⁾アミノ酸分析の結果では68%の類似性がある²⁰⁾とされている。したがってその抗原性にも類似性がみられ、交差反応を示す。

本研究に用いたウサギ抗ヒト PZP 抗血清は正常人血清で吸収してあるため免疫沈降反応レベルでの感度では α_2 -マクログロブリンと反応を示さない。しかし抗 PZP カラムに直接妊婦血清を流すと α_2 -マクログロブリンが

binding してしまう。そのため α_2 -マクログロブリンが Zn に高いアフィニティーを有している (Sinosich et al., 1983) ことを利用して PZP の精製を行った。Zn と PZP との affinity も決して低いものではないが α_2 -マクログロブリンに比べれば弱いと考えられ pH 6.5 の条件では殆どの PZP は結合しないことがわかった。全過程を終えた PZP の最終的な収量率は約30%であった。

PZP は PMN, MNC によく結合しその生理活性に影響

響を及ぼす。PMN に対してはその走化性を高め貪食・還元能は逆に低下させる。また MNC に対してはその走化性も貪食・還元能も低下させた。Fig. 8 より明らかに 2nd trimester での血中 PZP レベルに相当する 500 µg/ml の PZP では、PMN の走化性の促進効果 (300%) と MNC の走化性の抑制効果 (50%) は著明に発現していると思われる。PZP 単独では PMN の走化性に影響を与えず、ケモタキシン (カゼイン) 投与によりその走化性が上昇することから、PZP が PMN に結合することにより他の刺激に対し反応しやすい状態にさせるというふうに考えることができるが、いずれにしても PMN, MNC の貪食・還元能は PZP により低下し、外的因子に対する生体防御能は妊娠時には低下しているものと思われる。

妊娠中毒症では凝固系が抗進し血栓の生じやすい状態となっている。そのため特に胎盤では微小循環が破綻し部分的な梗塞、壊死がおこると考えられる。生じた血栓は種々のプロテアーゼにより融解される。一方 PZP はトリプシン、キモトリプシン等のプロテアーゼと高い結合能をもち、かつ結合した状態でも、それらプロテアーゼ活性は保持される。また PZP は絨毛及び胎盤のトロフォブラスト表面に大量に結合していることから PZP は胎盤局所で生じた血栓の融解に大きな働きをしているものと推測され、妊娠中毒症で PZP が上昇することにより、血栓が融解され、微小循環が回復され妊娠維持、あるいは、胎児の存続に大きな働きをしているものと考えられる。

アログラフトである胎児の存続を考える上でブロックインアンチボディーの概念があるが、妊娠中毒症で局所的な梗塞、壊死が生じた場合、いわゆる胎児の抗原はむき出しの状態になり、胎児の拒絶という問題につながる。その際、PZP は本研究により PMN, MNC の貪食能を抑制し、又 MNC の走化性を抑制し胎児の存続に大きな役割を果たしているのではないかと考えられる。

妊娠中毒症で EPH type の重症妊娠中毒症のみが高い PZP 値を示すのは EPH type が単に E.P.H. の合わさったものではなく複雑な病態がからまっているのではないかと推測されるが今後解決していかなければならない問題である。

V 結 語

正常妊婦血清の 2 次元電気泳動による Protein map を作成し、そこに現れた PZP のスポットの同定を行い、これを抗原として抗 PZP 血清を調整し、正常妊婦及び妊娠中毒病患者的血清 PZP を測定、更に正常妊婦血清

より PZP の精製を行った。またこの PZP を用いて PZP の生物学的活性について検討を行い以下の結果が得られた。

1. 2 次元電気泳動で PZP は、等電点 4.7、分子量 30 万に位置していた。

2. PZP は、正常妊婦の場合、2nd trimester でピークとなった。EPH type の重症妊娠中毒症患者では、同じ妊娠週数の正常妊婦の約 3 倍の PZP 値を示したものの、E.P.H. の各因子と PZP 値との間に相関はなく、少なくとも PZP 値の変動でみる限り、EPH type の重症妊娠中毒症は単純に E.P.H. 各因子の合わさったものではなく、別の病態が存在する可能性があることが示唆された。

3. 精製した PZP は、SDS-PAGE で単一の染色バンドとして示され、 α_2 -マクログロブリンの混入は認めなかった。

4. 蛍光抗体法により PMN, MNC の膜表面に PZP が結合することが確かめられた。

5. Boyden 法による走化性測定では、PZP を作用させることにより PMN の走化性は促進され、MNC の走化性は抑制された。

6. PZP により PMN, MNC の貪食・還元能は低下した。以上のことにより PZP は、PMN, MNC に結合し細胞性免疫抑制を多義にわたり発揮していることが示唆され、外的因子に対する生体防御能は妊娠時には低下しているものと考えられる。一方、胎児の存続というものを考えた場合、PZP は妊娠維持に大きな役割を担っているものと思われる。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った榎澤周三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました一條元彦教授並びに神谷知彌教授に深謝いたします。更に直接、御指導いただきました米増國雄助教授に感謝します。また、終始、御協力いただきました細菌学教室の諸兄に感謝の意を表します。

本論文の要旨は第 40 回日本産科婦人科学会 (1988 年、大阪) において発表した。

VI 文 献

- 1) Saul, W.R.: New placental proteins: chemistry, physiology and clinical use. Placenta 7: 575-594, 1986.
- 2) Thomson, A. W. and Horne, C.H.W.: Biological and clinical significance of pregnancy-associated α_2 -glycoprotein (α_2 -PAG)-a review. Invest. Cell

- Pathol. 3: 295-309, 1980.
- 3) **Smithies, O.:** Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum protein. *Adv. Protein. Chem.* **14**: 65-113, 1959.
 - 4) **Von Shoultz, B. and Torgny, S.:** Characterization of the "Pregnancy Zone Protein" in relation to other α_2 -globulins of pregnancy. *Biochimica et Biophysica Acta* **359**: 303-310, 1974.
 - 5) **O'Farrell, P.H.:** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021, 1975.
 - 6) **Manabe, T., Kojima, K., Jitsukawa, S., Hoshino, T. and Okuyama, T.:** Normalization of two-dimensional electrophoretic patterns of human plasma proteins and comparisons of cerebrospinal fluid and urin patterns in terms of the normalized map. *J. Biochem.* **89**: 841-853, 1981.
 - 7) **Stimson, W.H.:** Studies on the immunosuppressive properties of a pregnancy-associated α -macroglobulin. *Clin. exp. Immunol.* **25**: 199-206, 1976.
 - 8) **Boyden, S.:** The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. exp. Med.* **115**: 453-466, 1962.
 - 9) 楊井正紀, 森 剛一, 福田友子, 辻 芳郎: ルミノール添加による好中球の化学発光測定法. *炎症* **3**: 82-87, 1983.
 - 10) **Stratis, A. and Thérèse, T.:** The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry* **6**: 53-66, 1969.
 - 11) **Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F.:** Immunochemical quantitation of antigens by single radical immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**: 235-239, 1965.
 - 12) **Ouchterlony, Ö.:** Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy* **5**: 1-78, 1958.
 - 13) **Allen, R.C. and Loose, L.D.:** Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69**: 245-252, 1976.
 - 14) **Von Shoultz, B.:** A quantitative study of the pregnancy zone protein in the sera of pregnant and puerperal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (July) **15**: 792-797, 1973.
 - 15) **Stimson, W.H.:** Variations in the serum concentration of a pregnancy-associated α_2 -macroglobulin during pregnancy and after delivery. *J. Reprod. Fert.* **43**: 579-582, 1975.
 - 16) **Stimson, W.H. and Blackstock, J.C.:** Synthesis of a pregnancy-associated α_2 -macroglobulin by human leucocytes. *Experientia* **31**: 371-379, 1975.
 - 17) **Sand, O., Folkersen, J., Westergaard, J.G. and Sottrup-Jensen, L.:** Characterization of human pregnancy zone protein comparison with human α_2 -macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **260**: 15723-15735, 1985.
 - 18) **Van Leuven, F., Cassiman, J.J. and Van den Berghe, H.:** Human pregnancy zone protein and α_2 -macroglobulin, high affinity binding of complexes to the same receptor on fibroblasts and characterization by monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **261**: 16622-16625, 1986.
 - 19) **Gliemann, J., Moestrup, S., Jensen, P.H., Sottrup-Jensen, L., Andersen, H.B., Petersen, C.M. and Sonne, O.:** Evidence for binding of human pregnancy zone protein-proteinase complex to α_2 -macroglobulin receptors. *Biochem. Biophys. Acta* **883**: 400-406, 1986.
 - 20) **Sottrup-Jensen, L., Folkersen, J., Kristensen, T. and Tack, B.F.:** Partial primary structure of human pregnancy zone protein: Extensive sequence homology with human α_2 -macroglobulin. *Biochemistry* **81**: 7353-7357, 1984.
 - 21) **Chemnitz, J., Han, J., Svendsen, P., Folkersen, J., Westergaard, J.G. and Christensen, B.C.:** Immuno histochemical demonstration of human and murine pregnancy-associated serum proteins in maternal and placental tissue. *Bibl. Anat.* **22**: 87-92, 1982.
 - 22) **Poulsen, O.M. and Hau, J.:** Interaction between pregnancy zone protein and plasmin. *Arch. Gynecol. Obstet.* **243**: 157-164, 1988.